

This page Is Inserted by IFW Operations
And is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
Please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報(A)

昭64-29768

⑫ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和64年(1989)1月31日

G 01 N 33/543

A 61 B 10/00

G 01 N 33/543

33/553

E-7906-2G

T-7259-4C

Y-7906-2G

7906-2G

審査請求 未請求 発明の数 2 (全7頁)

⑭ 発明の名称 レーザ磁気免疫測定方法及び装置

⑮ 特 願 昭62-184902

⑯ 出 願 昭62(1987)7月24日

⑰ 発 明 者 藤 原 幸 一

茨城県那珂郡東海村大字白方字白根162番地 日本電信電話株式会社茨城電気通信研究所内

⑱ 発 明 者 水 谷 裕 迪

東京都千代田区内幸町1丁目1番6号 日本電信電話株式会社社内

⑲ 発 明 者 水 谷 弘 子

東京都渋谷区宇田川町6番11号

⑳ 出 願 人 日本電信電話株式会社

東京都千代田区内幸町1丁目1番6号

㉑ 代 理 人 弁理士 志賀 正武

明 細 書

1. 発明の名称

レーザ磁気免疫測定方法及び装置

2. 特許請求の範囲

(1) 所定の抗原あるいは抗体に磁性体微粒子を標識として付加した磁性体標識体と、検体たる抗体あるいは抗原とを抗原抗体反応させる第1工程と、該第1工程後の磁性体標識体と検体との複合体である磁性体標識検体を含む溶液に磁界を作用させてレーザ光照射領域に該磁性体標識検体を誘導・濃縮させる第2の工程を少なくとも含む、レーザ磁気免疫測定方法において、濃縮した該磁性体標識検体を磁力と液体の表面張力によりその運動を制御し、該制御に同期したレーザ反射光あるいは干渉縞を検出することを特徴とするレーザ磁気免疫測定方法。

(2) 前記工程が上方に開口を有する検査容器を用いて行われ、前記誘導・濃縮工程と、前記検出工程が、該検査容器の下方に置かれた電磁石と該電

磁石の磁心に対向して該検査容器の水面直上に置かれた磁極片によってなされ、該磁極片直下の該水面からの変動磁界周期に同期した反射光強度化を検出することによって行われることを特徴とする特許請求の範囲の第1項記載のレーザ磁気免疫測定方法。

(3) 前記検出工程において、検体の定量が前記磁性体標識検体の運動に起因して前記レーザ反射光中に現れる干渉縞を計数することによってなされることを特徴とする特許請求の範囲の第1項記載のレーザ磁気免疫測定方法。

(4) 磁性体標識検体を収容する上方に開口を有する検査容器と、レーザ光源を該検査容器の表面へ導く入射光学系と、該磁性体標識検体によるレーザ光の反射光の受光系と、該検査容器の表面直下の1点に該磁性体標識検体を誘導する濃縮機構と、濃縮後の該磁性体標識検体を周期的に駆動する駆動機構とを少なくとも含むレーザ磁気免疫測定装置であって、前記濃縮機構と、前記駆動機構が、電磁石と該電磁石の磁心に対向して前記検査容器

を挟むように設置された磁極片と、該電磁石を励磁する増幅とから構成され、前記周回に同期した反射光のみを選択的に検出する電子回路部を具備することを特徴とするレーザ磁気免疫測定装置。

(5) 前記検査容器または前記電磁石と前記磁極片のいずれかが、水平面で移動できるように構成されていることを特徴とする特許請求の範囲の第4項記載のレーザ磁気免疫測定装置。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、抗原抗体反応を利用した免疫測定方法及び装置に関するものである。更に詳述するならば、本発明は極めて微量の検体から特定の抗体または抗原を定量的に検出可能なレーザ磁気免疫測定方法及び装置に関するものである。

(従来の技術)

後天性免疫不全症候群、成人T細胞白血病等のような新型ウイルス性疾患、あるいは各種ガンの早期検査法として、抗原抗体反応を利用した免疫測定法の開発が、現在、世界的規模で推進されて

いる。

従来から知られる一次反応を利用した微量免疫測定法としては、ラジオイムノアッセイ(以下、RIA法と記す)、酵素イムノアッセイ(EIA)、蛍光イムノアッセイ法等が既に実用化されている。これらの方法は、それぞれアイソトープ、酵素、蛍光物質を標識として付加した抗原または抗体を用い、これと特異的に反応する抗体または抗原の有無を検出する方法である。

RIA法は、標識化されたアイソトープの放射線量を測定することにより抗原抗体反応に寄与した検体量を定量的なものであり、ピコグラム程度の超微量測定が可能な現在唯一の方法である。しかしながら、この方法は放射性物質を利用するので、特殊設備を必要とし、また、半減期等による標識効果の減衰等を考慮しなければならないので、実施には大きな制約がある。更に、放射性廃棄物処理が社会問題となっている現状を考慮すると、その実施は自ずと制限される。

一方、酵素、蛍光体を標識として用いる方法は、

抗原抗体反応に寄与した検体量を、発色や発光を標識することにより検出する方法であり、RIA法の如き実施上の制約はない。しかしながら、発色あるいは発光を精密に定量的なことは困難であり、検出限界はナノグラム程度である。

また、レーザ光を利用して抗原抗体反応の有無を検出する方法として、主に肝臓癌の検出を目的として開発されたAFP(アルファ・フェトプロテイン)を利用した方法がある。

この方法は、AFPに対する抗体をプラスチック微粒子に付加し、抗原抗体反応によってプラスチック粒子が凝集して生じる質量変化から調べる方法であり、 10^{-10} gの検出感度を達成している。これは、従来のレーザ光を用いた方法の百倍以上の感度であるが、RIA法に比較すると百分の一以下に過ぎない。更に、この方法が水溶液中における抗原抗体複合物のブラウン運動の変化を利用しているために、抗体を含む含む水溶液の温度、揺動、影響あるいは水溶液に混在する不純物粒子の影響を極めて受け易く、これ以上に検出

感度を高めることは原理的に望外のものである。

(発明が解決しようとする課題点)

上述のように、従来の免疫測定手段においては、高い検出感度を有するRIA法は、放射性物質を使用するために、その実施については多くの制約があり、一方、実施の容易な酵素イムノアッセイ法、蛍光イムノアッセイ法等は感度が低く、精密な定量的測定ができなかった。

そこで、本発明の目的は、RIAに匹敵する検出感度並びに精度を有しながら、実施上の制限のない新規な測定方法及び装置を提供することにある。

(課題点を解決するための手段)

即ち、本発明に従うと、所定の抗原あるいは抗体に磁性微粒子を標識として付加した磁性体標識体と、検体たる抗体あるいは抗原とを抗原抗体反応させる第1工程と、該第1工程後の磁性体標識体と検体との複合体である磁性体標識検体を含む溶液に磁界を作用させてレーザ光照射領域に該磁性体標識検体を誘導・凝縮させる第2の工程と

を少なくとも含むレーザ磁気免疫測定方法において、前記した磁性標識検体を磁力と液体表面張力によりその運動を制御し、該制御に同期したレーザ反射光あるいは干渉縞を検出することを特徴とするレーザ磁気免疫測定方法が提供される。

本発明の好ましい態様に従うと、前記工程が上方に開口を有する検査容器を用いて行われ、前記調導・振動工程と、前記検出工程が、該検査容器の下方に置かれた電磁石と該電磁石の磁心に対向して該検査容器の水面直上に置かれた磁極片によってなされ、該磁極片直下の該水面からの変動磁界周波数に同期した反射光強度変化を検出することによって行われる。

また、前記検出工程において、検体の定価が前記磁性体標識検体の運動に起因して前記レーザ反射光中に現れる干渉縞の数を計数することによってなされる。

また、本発明に従うと、磁性体標識検体を収容する上方に開口を有する検査容器と、レーザ光源を該検査容器の表面へ導く入射光学系と、該検体

によるレーザ光の反射光の受光系と、該検査容器の表面直下の1点に該磁性体標識検体を振動する振動機構と、該磁性体標識検体を周期的に駆動する駆動機構とを少なくとも含むレーザ磁気免疫測定装置において、前記振動機構と、前記駆動機構が、電磁石と該電磁石の磁心に対向して前記検査容器を挟むように設置された磁極片と、該電磁石を駆動する電源とから構成され、前記周波数に同期した反射光のみを選択的に検出する電子回路部を具備することを特徴とするレーザ磁気免疫測定装置が提供される。

本発明の好ましい態様に従うと、前記検査容器または前記電磁石と前記磁極片のいずれかが、水平面内で移動する機構が具備されている。

(作 用)

本発明に従うレーザ磁気免疫測定方法は、標識物質として磁性微粒子を利用し、該磁性微粒子の磁界中での運動に起因するレーザ反射光変化あるいは干渉縞変化を検出することをその主な特徴としている。

即ち、磁性微粒子が放射線あるいは毒性等の問題を有しないことはいうまでもなく、これを利用することに格別の制約はない。また、磁性体微粒子には、マグネタイトやアーフェライト等の各種化合物磁性体あるいは鉄、コバルト等の金属磁性体等種々の材料によるものがあり、検体に対して安定な標識物質を容易に選択することができる。

標識物質が磁性体であることを利用して、前記磁性体標識検体、検体あるいは磁性体標識検体を磁力によって選択的に操作することが出来る。即ち、未反応の磁性体標識検体を検体から分離除去したり、磁性体標識検体を特定の位置に誘導しあるいは濃縮する操作は、この特徴によって実現される。

本発明者らは、先に特開昭61-224567、61-252427、61-254164、62-22062としてレーザ磁気免疫測定及び測定装置についての発明を特許出願しているが、これらの特許出願に関わる測定方法及び測定装置では、磁性体標識検体からの散乱光あるいは透過光を検出することによってなされていた。本発明者らは

磁性体標識検体からの反射光を検出する方法を研究したところ、本発明の構成に特有の効果として、交流磁場と同期した反射光の強度変化が生じることを発見した。即ち、前述のように、前記磁極片直下の水面に濃縮された磁性体標識検体は、前記電磁石を強励磁すると該磁性体標識検体が該磁極片に強く吸引されるため該磁極片直下の水面が極僅か隆起する現象が生じる。磁力による該磁性体標識検体の吸引を停止すると、隆起した水面は水の表面張力のため自動的に水平に戻る。

この水面の微小隆起部分にレーザ光を照射すると、反射光中には隆起の度合いに応じた干渉縞が生じる。この干渉縞は水面上の浮遊物によっても生じるため、磁界変動と同期する干渉縞のみ検出すれば外乱物の影響を受けない。なお、前記磁性体標識検体の量がピコグラム以下になると、干渉縞は1本以下になるが磁界変動と同期して反射光の強度が変化するので、強度変化を検出すればよい。

これらの本発明の特徴的な構成によって、同じレーザ光を利用しながら、AFPを利用した方法

の限界を突破することが出来る。また、このような特徴は、単に検出感度の向上に与するのみならず測定の前自動化をも極めて容易にする。

(実施例)

以下に図面を参照して本発明をより具体的に詳述するが、以下に示すものは本発明の一実施例に過ぎず、本発明の技術的範囲を何等制限するものではない。

第1図は本発明の一実施例を説明する、レーザ磁気免疫測定装置の略図である。

1は検査容器、2は該検査容器中の上方に開口する検体収容部、3は電磁石、4は該電磁石の磁心、5は磁極片、6はレーザ光源(入射光学系)、7はレーザ入射光軸、8は反射光検出軸、9はスリット(受光系)、10はフォトランスタから成る受光素子(受光系)、11は磁極片保持部品、12は該検査容器の移動用案内溝、13は電磁石支持台、100は電子回路部である。

前記検査容器1の検体収容部2には、例えば抗原抗体反応後の磁性体標識検体を含む溶液が収容

されている。この場合の磁性体標識検体は、所定

抗原あるいは抗体に磁性体微粒子を標識として付加した磁性体標識検体と、検体たる抗体あるいは抗原とを抗原抗体反応させることによって得たものである。したがって磁性体標識検体は、磁性体標識検体と検体との複合体である。該検査容器並びに検体の調整方法は、先に本発明者が発明した特開昭61-22063に記載の検体容器並びに検体の調整方法が適用できる。該検査容器は前記案内溝12に沿って水平面内で一方向に移動できるから、多数の検体の測定が同一容器で連続して行うことが出来る。

前記電磁石3の磁心4及び磁極片5は残留磁化の少ない高透磁率材料が好ましく、例えば純度の高い純鉄あるいはパーマロイ合金が推奨される。該電磁石3の磁心4の径は前記検査容器1の検体収容部2の口径よりも充分大きく、かつ、該磁極片5の径は検査容器1の検体収容部2の口径よりも充分小さいことが必須である。例えば、検体収容部2の口径が10mmの場合、磁心4及び磁極片5

の直径はそれぞれ50mm、2mmである。さらに、磁極片5は磁心4に対向する側の先端が鋭利であることが好ましい。磁極片5は磁極片保持部品11にネジ止めされ、磁極片5と検査容器1との間隙が調整可能である。

レーザ入射光軸7と反射光検出軸8は前記検査容器1の水面に対して同じ角度で設定されていることが必要であり、本実施例ではそれらの角度 θ は45度であった。スリット8は磁極片5の直下に設置された磁性体標識検体からの反射光のみを受光素子10に導くために使用されている。

第2図は本発明の装置の動作原理を説明する図であって、14は前記電磁石3を励磁するための電源、20は磁性体標識検体、21は水面の隆起部である。(a)は調整済みの検体が前記検体収容部2に入れられた直後の状態、(b)は前記電磁石3が電源14に接続され、直流励磁の状態、(c)は該電磁石3が強励磁の状態、(d)は弱励磁状態、に与ける前記磁性体標識検体20の分散状態を模式的に示している。前記電源14は好ましくは直

流と交流の両方が出力される。本実施例では、該電源14はファンクションジェネレータと、電流増幅器とから構成されている。前記強励磁と弱励磁は例えば正弦波あるいは矩形波あるいは矩形波を該ファンクションジェネレータで生成することにより達成される。

工程(a)では電磁石3は非励磁であるから、磁性体標識検体20は容器中で一様に分布している。工程(b)では検査容器1の直上に置かれた磁極片5に電磁石3から発生した磁束が集中するため、磁性体標識検体20は磁極片5直下の水面に凝縮される。従って、磁極片5の先端が鋭利であることが望ましい。工程(c)、工程(d)は磁極片5の直下に凝縮された磁性体標識検体20を交流励磁し、該検体20からのレーザ反射光を検出する工程である。電源14を強励磁状態にすると、磁性体標識検体20が強く磁極片5に吸引されるため、磁性体標識検体20の周りの水面が隆起する。電源14を弱励磁状態にすると水の表面張力のため、隆起した水面は平坦になる。従って、電磁石3を

水面が隆起するに充分に電流で交番励磁すれば、磁極片5の直下の水面からの反射光は励磁周期と同期して、該反射光強度が変化することになる。

第3図は、第1図に於いて、受光器10の位置に白板を垂直に置いたとき反射光中に現れる干涉縞を示す図であって、22は反射光束、23は干涉縞である。水面の隆起の度合は磁性体標識検体20の量に比例するため、隆起の高さが使用するレーザ光の1/2波長よりも大きい場合、反射光中に、第3図示すような、干涉縞が現れる。従って、該干涉縞の縞の数から磁性体標識検体20の量を知ることが出来る。

なお、磁性体標識検体20からの反射光の検出は交番周波数に同期した変動分のみを検出すれば、外乱あるいはバックグラウンドの影響を極めて有効に除去できる。該周波数は0.05 Hzから100Hzの範囲が適当である。0.05 Hz以下では測定に長時間を要すること、100Hz以上では検体が追従しないためである。

しかして、この実施例においては、磁性体標識

子を用いた場合にも最も特徴を発揮できる構造になっている。本発明においては、磁力による磁性体標識検体の吸引に対して、表面張力を磁性体標識検体の運動の復元力として作用させているため、本発明者らが先に発明した、拡散現象を復元力として利用する方法に比べ、応答速度が10倍以上改善された。従って、極めて効率的に磁性体標識検体からの反射光の制御が出来るから、RIA法に匹敵する超高精度な抗原抗体反応検査を高感度を実現出来る。更に、標識体として用いる磁性超微粒子は、放射線あるいは毒性の点では問題なく、検体に対して安定なものを容易に入手できる。

この発明に従うレーザ磁気免疫方法及び装置は、抗原抗体反応のみに止まらず、従来RIA法が適用されていたペプチドホルモン等の種々のホルモンあるいは種々の酵素、ビタミン、薬剤などの測定にも応用することが可能である。

従って、従来は限定された施設でRIA法によらなければ実施できなかった精密な測定を、一般的な環境で広く実施することが可能となる。集団

検体20からの反射光は受光素子10によって受光される。受光素子10の出力は電子回路部100に供給され、電子回路部100は、上記励磁周期に同期した反射光のみを選択的に検出する。これにより、極微量の磁性体標識検体を検出することができる。

本発明のレーザ磁気免疫測定装置を用いて、磁性超微粒子を標識したインフルエンザウイルスの検出を試みた結果、従来の酵素免疫測定法(EIA)の場合、1億個程度ウイルスが存在しなければ検出できなかったのに対して、本発明の方法では10個程度のウイルスでも検出できることが明らかにになった。

なお、上記の実施例においては検査容器1を水平面内で移動できるように構成したが、この構成に代えて検査容器に対して電磁石と磁極片を水平面内で移動させるように構成してもよい。

(発明の効果)

以上詳述のように、本発明に従うレーザ磁気免疫測定方法及び装置は、標識物質として磁性超微

粒子を用いた場合にも最も特徴を発揮できる構造になっている。本発明においては、磁力による磁性体標識検体の吸引に対して、表面張力を磁性体標識検体の運動の復元力として作用させているため、本発明者らが先に発明した、拡散現象を復元力として利用する方法に比べ、応答速度が10倍以上改善された。従って、極めて効率的に磁性体標識検体からの反射光の制御が出来るから、RIA法に匹敵する超高精度な抗原抗体反応検査を高感度を実現出来る。更に、標識体として用いる磁性超微粒子は、放射線あるいは毒性の点では問題なく、検体に対して安定なものを容易に入手できる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の一実施例を説明する、レーザ磁気免疫測定装置の概略図、第2図(a)～(d)は本発明の装置の動作原理を説明する図であって、同図(a)は調整済みの検体が前記検体収容部2に入れられた直後の状態、同図(b)は電磁石3が電磁14に接続され、直流励磁された状態、同図(c)は電磁石3が強励磁された状態、同図(d)は電磁石3が弱励磁された状態、における磁性体標識検体20の分散状態を示す模式図、第3図は反射光中に現れる干涉縞を示す図、である。

1 …… 検査容器、

3 …… 電磁石、

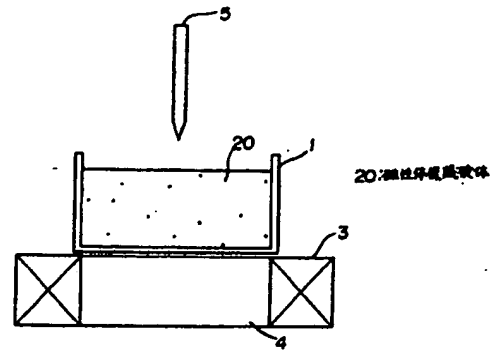
- 4 --- 誘電磁石の磁心、
- 5 --- 磁極片、
- 6 --- 入射光学系（レーザ光源）、
- 9 --- 受光系（スリット）、
- 10 --- 受光系（受光素子）、
- 14 --- 電源、
- 20 --- 磁性体被覆被体、
- 100 --- 電子回路部。

出願人 日本電信電話株式会社

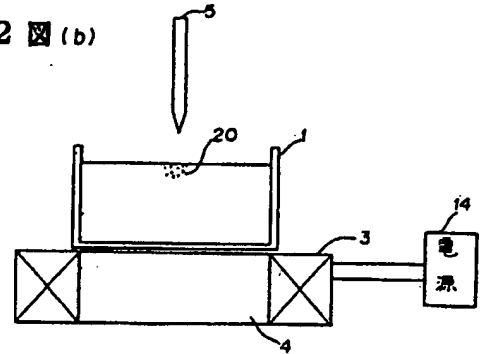
代理人 弁理士 志賀正 誠



第2図 (a)

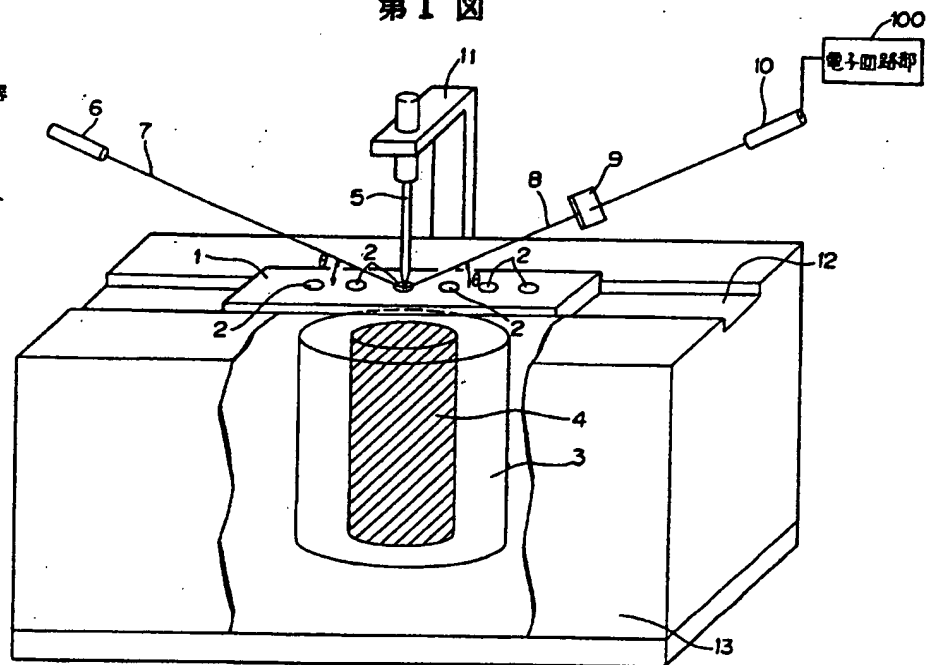


第2図 (b)

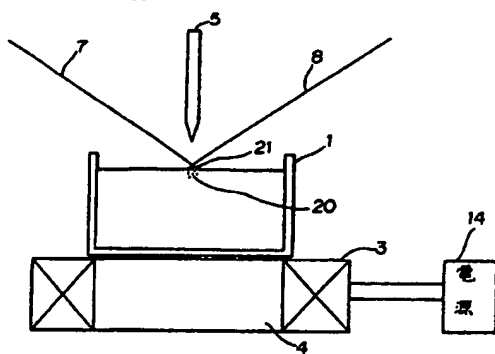


第1図

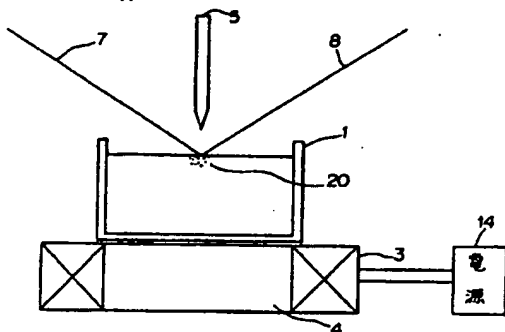
- 1: 検査器
- 3: 電磁石
- 4: 磁心
- 5: 磁極片
- 6: 入射光学系
- 9, 10: 受光系



第2図 (c)



第2図 (d)



第3図

